WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6:

C07H 1/08, C12Q 1/68, C12N 15/10, C12M 1/00

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:

WO 97/34908

A1

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:

25. September 1997 (25.09.97)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/DE97/00517

(22) Internationales Anmeldedatum:

14. März 1997 (14.03.97)

(30) Prioritätsdaten:

196 10 354.1

15. März 1996 (15.03.96)

DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): NOVA GESELLSCHAFT ZUR ENTWICKLUNG UND VERMARKTUNG INNOVATIVER PRODUKTE MBH [DE/DE]; Rebhuhnstrasse 15, D-68307 Mannheim (DE).

(72) Erfinder: und

- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LANGE, Hans [DE/DE]: Römerstrasse 99 D, D-68623 Lampertheim (DE).
- (74) Anwalt: GASSNER, Wolfgang; Bissel Salleck & Partner, Nürnberger Strasse 71, D-91052 Erlangen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL,

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(54) Title: PROCESS AND DEVICE FOR ISOLATING NUCLEIC ACIDS

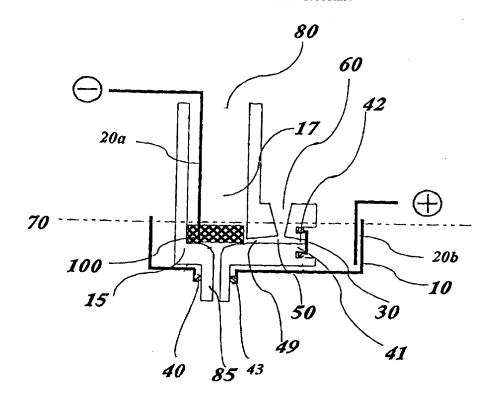
(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR ISOLIERUNG VON NUKLEINSÄUREN

(57) Abstract

The invention relates a device for isolating nucleic acids from biological fluids and suspensions which contain nucleic acids. In the device, a reaction chamber (17) containing an adsorbent (100) is connected to a discharge chamber (50) and the nucleic acids can, by means of an electrophoresis device (20a, 20b), be transferred from the reaction chamber (17) to the discharge chamber (50) and concentrated.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur Isolierung von Nukleinsäuren aus biologischen nukleinsäurehaltigen Flüssigkeiten und Suspensionen, wobei ein Reaktionsraum (17) zur Aufnahme eines Adsorptionsmittels (100)mit einem Entnahmeraum (50) verbunden ist, und wobei die Nukleinsäuren vom Reaktions-(17) in den Entnahmeraum (50) mittels einer Elektrophoresevorrichtung (20a, 20b) beweg- und anreicherbar sind.



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
l -	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
n	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
ch	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
en Latar	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
Ischan	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
-Herzegowina		•	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
\$	GH	Ghana	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
	GN	Guinea	MIN	Republik Mazedonien	TR	Türkei
Faso	GR	Griechenland		•	TT	Trinidad und Tobago
n	HU	Ungarn	ML	Mali	UA	Ukraine
	ΙE	Irland	MN	Mongolei		
1	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
	IS	Island	MW	Malawi	us	Vereinigte Staaten von
	IT	Italien	MX	Mexiko		Amerika
frikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
-	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
voire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neuseeland	zw	Zimbabwe
n		Korea	PL	Polen		
-	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
	KZ	Kasachstan	RO	Rumānien		
ische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
land	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
			SE	Schweden		
u n.			SG	Singapur		
iand irk		LK LR	LK Sri Lanka	LK Sri Lanka SE	LK Sri Lanka SE Schweden	LK Sri Lanka SE Schweden

Verfahren und Vorrichtung zur Isolierung von Nukleinsäuren

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zur 5 Isolierung von Nukleinsäuren.

Vor der Analyse von aus Zellen gewonnenen Nukleinsäuren mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) ist es erforderlich, die Nukleinsäuren aufzureinigen und aufzukonzentrieren.

- Ferner kann es notwendig sein, aus der zu analysierenden Probe bestimmte die Polymerasekettenraktion störende Substanzen, wie die prosthetische Gruppe von Hämoglobin, von der Probe abzutrennen.
- Daneben spielt auch bei anderen Techniken zur Analyse von Nukleinsäuren, bsp. der Hybridisierung, eine Aufreinigung und Aufkonzentration der zu analysierenden Nukleinsäuren eine wichtige Rolle.
- Aus "Methods of Enzymology", Vol. 68, S. 170 182, ist es bekannt, zur Isolierung von Nukleinsäuren sog. "Spin-columns" zu verwenden. Dabei werden in einer aus der DE 41 39 664 Al bekannten Variante folgende Arbeitsschritte verwendet:
- 25 aa) Zellaufschluß,

30

- bb) Adsorption der Nukleinsäuren an einem Glasfaservlies in Gegenwart eines Puffers mit hoher Ionenstärke und
- cc) Elution der Nukleinsäuren mit einem Puffer geringer Ionenstärke.

Beim Schritt lit.aa) wird die flüssige Probe durch ein Glasfaservlies geleitet, an dem die Nukleinsäuren adsorbieren. Anschließend wird das Glasfaservlies mit

2

verschiedenen Lösungen gewaschen. Schließlich werden die Nukleinsäuren in Anwesenheit von Puffern geringer Ionenstärke von der Festphase eluiert.

Das bekannte Verfahren ist in mehrfacher Hinsicht nachteilig: Beim Waschen der Festphase kann es zur Kontamination der Probe kommen. Außerdem können wegen der im Glasfaservlies herrschenden Kapillarkräfte die Nukleinsäuren nur zum Teil daraus zurückgewonnen werden.

10

15

Des weiteren sind aus "Methods in Enzymology 65" (1980), S. 371 - 380 gelelektrophoretische Methoden bekannt, bei denen mittels und danach Gele gebunden Nukleinsäuren an Elektroelution wieder in Lösung gebracht werden. Auch dabei kann es zu Kontamination der Lösung kommen. Die Nukleinsäuren hoher Verdünnung vor. Eine in Lösung liegen der Aufkonzentration findet nicht statt.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein Verfahren und eine Vorrichtung anzugeben, mit denen die Nachteile 20 Stands der Technik vermieden werden. Insbesondere soll ein Isolierung von eine Vorrichtung zur und Verfahren werden, die eine einfache und Nukleinsäuren angegeben Aufkonzentration von kostengünstige Aufreinigung und Nukleinsäuren ermöglichen. Außerdem soll eine weitgehend 25 Aufkonzentration und Isolation automatisierte Nukleinsäuren durchführbar sein. Schließlich bezweckt die Erfindung die Vermeidung von Kontaminationen.

Diese Aufgabe wird durch die Merkmale der Ansprüche 1 und 12 gelöst. Zweckmäßige Ausgestaltungen des Verfahrens bzw. der Vorrichtung ergeben sich aus den Merkmalen der Ansprüche 2 bis 11 sowie 13 bis 41.

3

Nach Maßgabe der Erfindung ist ein Verfahren zur Isolierung Nukleinsäuren aus biologischen nukleinsäurehaltigen Flüssigkeiten und Suspensionen vorgesehen, wobei

5

- a) die Nukleinsäuren an ein Adsorptionsmittel gebunden werden,
- b) die Nukleinsäuren vom Adsorptionsmittel eluiert und

10

25

30

- c) durch Elektrophorese von einem Reaktionsraum in einen damit verbundenen Entnahmeraum bewegt und dort angereichert werden.
- 15 Das Verfahren ermöglicht auf einfachem Weg eine Aufreinigung und Aufkonzentration von Nukleinsäuren aus Flüssigkeiten. Insbesondere bei einer automatischen Verfahrensführung kann das Risiko einer Kontamination weitgehend ausgeschlossen werden. Die Elution kann durch Pufferwechsel oder elektrisch 20

durch Elektroelution bzw. Elektrophorese erfolgen.

Nach weiterer Maßgabe der Erfindung ist eine Vorrichtung zur Isolierung von Nukleinsäuren aus biologischen nukleinsäurehaltigen Flüssigkeiten und Suspensionen vorgesehen, wobei ein Reaktionsraum zur Aufnahme eines mit Nukleinsäuren beladenen Adsorptionsmittels mit einem Entnahmeraum verbunden ist, und wobei die Nukleinsäuren mittels einer Elektrophoreseeinrichtung vom Reaktions- in den Entnahmeraum bewegbar und dort anreicherbar sind. - Diese Vorrichtung ermöglicht eine einfach und kostengünstig durchführbare Aufkonzentration und Isolierung von Nukleinsäuren. Durch das Vorsehen eines besonderen

Entnahmeraums kann eine Kontamination weitgehend ausgeschlossen werden.

Nachfolgend werden Ausführungsbeispiele der Erfindung anhand 5 der Zeichnung näher erläutert. Hier zeigen:

- Fig. 1 eine schematische Querschnittsansicht eines ersten Ausführungsbeispiels der Vorrichtung,
- 10 Fig. 2 das Ausführungsbeispiel gemäß Fig. 1 mit "Spin-Column",
 - Fig. 3 eine schematische Querschnittsansicht eines zweiten Ausführungsbeispiels der Vorrichtung,
- Fig. 4 eine schematische Querschnittsansicht durch ein erstes Ausführungsbeispiel einer Aufreinigungs- und Anreicherungsvorrichtung mit einer Vorrichtung gemäß Fig. 3,
- Fig. 5 eine Draufsicht auf ein Agaroseflachbettgel,
 - Fig. 6a eine schematische Querschnittsansicht eines dritten Ausführungsbeispiels der Vorrichtung,
- Fig. 6b eine Abwandlung des in Fig. 6a gezeigten
 Ausführungsbeispiels,
- Fig. 6c eine schematische Querschnittsansicht eines vierten
 Ausführungsbeispiels der Vorrichtung,
 - Fig. 7a eine Untersicht eines fünften Ausführungsbeispiels der Vorrichtung,

Fig.	7b	eine	Draufsicht	auf	das	Ausführungsbeispiel	gemäß
		Fig.	7a,				

- Fig. 7c eine schematische Seitenansicht des Ausführungsbeispiels gemäß Fig. 7a,
 - Fig. 7d eine perspektivische Ansicht eines Deckels für ein erstes Ausführungsbeispiel einer Elutionsvorrichtung,

Fig. 7e eine perspektivische Ansicht des ersten Ausführungsbeispiels der Elutionsvorrichtung ohne Deckel,

10

20

- 15 Fig. 7f eine perspektivische Ansicht des Ausführungsbeispiels gemäß Fig. 7a bis 7c,
 - Fig. 8 eine schematische Querschnittsansicht durch ein sechstes Ausführungsbeispiel der Vorrichtung,

Fig. 9 eine schematische Querschnittsansicht durch eine beschichtete Elektrode,

- Fig. 10 eine schematische Querschnittsansicht durch ein siebtes Ausführungsbeispiel der Vorrichtung,
 - Fig. 11 eine schematische Querschnittsansicht durch ein achtes Ausführungsbeispiel der Vorrichtung,
- Fig. 12 eine Draufsicht auf ein zweites Ausführungsbeispiel einer Elutionsvorrichtung und
- Fig. 13 eine schematische Querschnittsansicht durch ein zweites Ausführungsbeispiel einer Aufreinigungsund Anreicherungsvorrichtung.

In Fig. 1 ist ein schematischer Querschnitt eines ersten Ausführungsbeispiels der Vorrichtung gezeigt. In bodenseitigen einem 10 mit Elektrophoresepuffertank Durchbruch 43 ist ein Behälter 15 aufgenommen. Der Behälter 15 umschließt einen Reaktionsraum 17, welcher über einen Kanal 49 mit einem Entnahmeraum 50 verbunden ist. Das Volumen des Reaktionsraums 17 beträgt vorzugsweise 1 bis 20 ml. Der Entnahmeraum 50 ist mittels einer eine erste Öffnung verschließenden ersten permeablen Membran 30 ionenleitend mit 10 Elektrophoresepuffertank 10 aufgenommenen Elektrophoresepuffer verbunden. Das Volumen des Entnahmeraums 50 beträgt vorzugsweise 0,005 bis 0,1 ml. Die erste permeable Membran 30 ist z.B. aus einer Dialysemembran gebildet, welche für Nukleinsäuren nicht durchlässig, für Salze, insbesondere 15 chaotrope Salze, jedoch durchlässig ist. Die erste permeable Membran 30 ist mittels eines flexiblen Rings, bsp. eines Obefestigt. Stutzen 41 ersten auf einem Rings, Reaktionsraum 17 ist ein Adsorptionsmittel 100, bsp. umfangene Silika, Glasperlen, mit Glas 20 Glasfaservlies, ο. Anionenaustauscher Partikel, magnetische aufgenommen. In den Reaktionsraum 17 ragt durch eine zweite Öffnung 80 eine Kathode 20a. Eine Anode 20b taucht in den im Elektrophoresepuffertank 10 befindlichen Elektrophoresepuffer ein, dessen Füllstand mit 70 bezeichnet ist. Unterhalb des 25 Adsorptionsmittels 100 erstreckt sich vom Behälter 15 ein zweiter Stutzen 85, der den Durchbruch 43 durchgreift. Der zweite Stutzen 85 ist mittels eines O-Rings 40 gegenüber dem Elektrophoresepuffertank 10 abgedichtet. - Der Entnahmeraum 50 weist eine Entnahmeöffnung 60 auf. Er ist so ausgebildet, 30 daß Lufteinschlüsse vermieden werden. Der Entnahmeraum 50 kann insbesondere als Kapillare ausgebildet sein.

Fig. 2 zeigt im wesentlichen das in Fig. 1 gezeigte erste 35 Ausführungsbeispiel. Dabei ist im Reaktionsraum 17 ein "Spin-

7

column" 90 aufgenommen. Ein den Elektrophoresepuffertank 10 durchgreifender zweiter Stutzen 85 ist hier nicht vorgesehen.

In Fig. 3 ist eine schematische Querschnittsansicht durch ein zweites Ausführungsbeispiel der Vorrichtung gezeigt. Dabei befindet sich die Kathode 20a außerhalb des Reaktionsraums 17. Sie taucht direkt in den Elektrophoresepuffertank 10 ein. Am den Reaktionsraum 17 umgreifenden Teil des Behälters 15 ist ein dritter Stutzen 45 vorgesehen, dessen dritte Öffnung 46 durch eine zweite permeable Membran 31 verschlossen ist.

5

10

30

35

Fig. 4 zeigt eine schematische Querschnittsansicht durch ein Ausführungsbeispiel einer Aufreinigungsund Anreicherungsvorrichtung mit der Vorrichtung gemäß Fig. 3. 15 Die Vorrichtung gemäß Fig. 3 befindet sich im Wirkbereich eines x, y,z-Pipettors, dessen x,y,z-Pipettierarm mit ist. Der x,y,z-Pipettierarm bezeichnet 190 Pipettierspitze 180, vorzugsweise eine Wegwerfspitze, Ein geeigneter x,y,z-Pipettor wird bsp. von der Firma TECAN 20 AG, Schweiz, angeboten. Ferner ist im Wirkbereich des x,y,z-Pipettors ein heizbarer Schüttelbock 170 angeordnet. Schüttelbock 170 sind Reaktionsröhrchen 150 für die Lyse aufgenommen. Daneben befinden sich ein erstes Gefäß 160 für die Lyse, ein zweites Gefäß 162 zur Aufnahme für eine 25 Waschlösung sowie Probengefäße 165. Mit 185 ist ein Vorrat an Pipettenspitzen und mit 210 sind PCR-Gefäße bezeichnet.

Der Elektrophoresepuffertank 10 ist mit einem Füllstutzen 125 versehen, der mit einem Elektrophoresepuffervorrat 110 unter Zwischenschaltung einer Pumpe 120 verbunden ist. Der zweite Stutzen 85 sowie eine am Boden des Elektrophoresepuffertanks 10 vorgesehene Ableitung 140 stehen mit einer zweiten Pumpe 130 in Verbindung. Die zweite Pumpe 130 ist vorzugsweise als Schlauchpumpe ausgeführt. Eine geeignete Schlauchpumpe wird bsp. von der Firma Cavro, Kalifornien, USA, angeboten. Die

8

20a sowie die Anode 20b sind über elektrische Zuleitungen 225a bzw. 225b mit einer Spannungsquelle 220 verbunden. Die erste 120 und die zweite Pumpe 130, x,y,z-Pipettor die Schüttelbock 170. der Spannungsquelle 220 sind so ausgeführt, daß sie mittels eines Somit Prozeßrechners ansteuerbar sind. Aufreinigungsder und Betrieb vollautomatischer Anreicherungsvorrichtung möglich.

5

35

- In Fig. 5 ist eine Draufsicht auf eine besonders einfache Variante eines Behälters 15 gezeigt. Dieser ist aus einem Agaroseflachbettgel 11 hergestellt, an dessen gegenüberliegenden Querseiten die Kathode 20a und die Anode 20b anliegen. Im Agaroseflachbettgel 11 ist eine erste den Reaktionsraum 17 bildende Ausnehmung 81 zur Aufnahme von Adsoptionsmittel und eine zweite Ausnehmung 61 vorgesehen. Die zweite Ausnehmung 61 ist schlitzförmig ausgebildet. Sie dient zur Entnahme der darin angereicherten Nukleinsäuren.
- In Fig. 6a ist eine schematische Querschnittsansicht durch 20 ein drittes Ausführungsbeispiel der Vorrichtung Form eines 15 Behälter in ist der Kreuzverbindungsstücks ausgebildet. Das Adsorptionsmittel 100 befindet sich auf einem Stützvlies 302. Die Kathode 20a und elektrisch leitfähige als 20b sind 25 Anode die ausgebildet, die mit Kunststoffpipettenspitzen Elektrophoresepuffertank (hier nicht gezeigt) in Verbindung stehen. Sie sind mit dem Behälter 15 über Schlauchstücke 318 angereichte Nukleinsäuren Entnahmeraum 50 verbunden. Im können durch die Entnahmeöffnung 60 abgezogen werden. 30

Wie in Fig. 6b gezeigt ist, können zwischen dem Entnahmeraum 50 sowie einem Zwischenraum 321 weitere Stützvliese 303 angeordnet sein. Bei dem in Fig. 6c gezeigten vierten Ausführungsbeispiel sind die Öffnungen der als

35

Kunststoffpipettenspitzen ausgebildeten Elektroden 20a bzw. 20b verschlossen.

In den Fig. 7a bis 7c ist ein fünftes Ausführungsbeispiel der Vorrichtung in verschiedenen Ansichten gezeigt. Dabei besteht Behälter 15 aus einem quaderförmigen Reaktionsraum 17 ist durch eine Bohrung gebildet. An beiden Seiten sind neben dem Reaktionsraum 17 Ausnehmungen 320, 321 zur Aufnahme der Kathode 20a bzw. der Anode 20b vorgesehen. 10 Wand zwischen den Ausnehmungen 320, 321 dem Reaktionsraum 17 ist ionenleitend ausgebildet. Die 320 Ausnehmungen dienen zur Aufnahme von Elektrophoresepuffer. Sie sind mit Stopfen 340 verschlossen. Elektrophoresepuffertank besteht bei dieser 15 Ausführungsform Teilbehältern, aus zwei welche den Reaktionsraum 17 umgeben. Eine Mehrzahl derartiger Vorrichtungen, von denen in Fig. 7f nochmals perspektivisch gezeigt ist, können Bestandteile des in den Fig. 7d und 7e gezeigten ersten Ausführungsbeispiels einer 20 Elutionsvorrichtung sein. Die Elutionsvorrichtung besteht im wesentlichen aus einem Mehrfachbehälter 410 zur Aufnahme mehrerer Vorrichtungen gemäß Fig. 7f. Der Mehrfachbehälter 410 weist einen Vakuumanschluß 401 sowie Anschlüsse 402 für einen Flüssigkeitskreislauf zum Beheizen der 25 Elutionsvorrichtung auf. Ein in Fig. 7d gezeigter Deckel 400 ist mit Zuleitungen 226a, 226b für die Elektroden versehen.

In ist ein sechstes Ausführungsbeispiel Vorrichtung gezeigt. Dabei ist die Kathode 20a in die Wand Reaktionsraums 17 und die Anode 20b die gegenüberliegende Wand des Entnahmeraums 50 integriert. Im Entnahmeraum 50 ist eine permeable, insbesondere eine semipermeable, Membran 310 vorgesehen, welche für Nukleinsäuren undurchlässig ist. Die Membran 310 verhindert, daß die Nukleinsäuren direkt an die Anode 20b gelangen und

PCT/DE97/00517

10

dort durch Redoxprozesse zerstört werden. - Das Adsorptionsmittel 100 ist über ein Stützvlies 302 am Eingang des zweiten Stutzens 85 abgestützt.

Fig. 9 zeigt eine schematische Querschnittsansicht durch eine 5 beschichtete Elektrode. Eine aus einem Edelmetall, wie Gold, Silber oder Platin, oder elektrisch leitfähigem Kunststoff hergestellte Kathode oder Anode 20a bzw. 20b ist mit einer aus mehreren Lagen bestehenden Beschichtung versehen. Eine erste 323 auf das Edelmetall oder den Kunststoff aufgebrachte 10 Lage besteht aus biotinyliertem Rinderserum Albumin, zweite Lage 325 besteht einem aus auflagernde Streptavidin oder Polystreptavidin und eine äußere dritte Lage 324 ist aus einem Oligonukleotid gebildet.

15

WO 97/34908

Bei dem in Fig. 10 gezeigten siebten Ausführungsbeispiel der Vorrichtung ist ein beweglicher Permanentmagnet 312 an der Außenseite des Behälters 15 so angeordnet, daß sein Nordpol in der Nähe der Kathode 20a sich befindet. Der Reaktionsraum durchsichtigen Schnappdeckel mit einem 20 17 ist verschlossen. Der Entnahmeraum 50 ist mit einem Schnappdeckel 326 verschlossen, der mit einem Septum 328 versehen ist. Das Septum 328 kann zur Entnahme bzw. zur Zugabe von Flüssigkeit mittels einer Nadel 327 durchstochen werden. So kann eine Kontamination der in der Vorrichtung befindlichen Flüssigkeit 25 vermieden werden. Mit 314 ist ein Photomultiplier bezeichnet, der oberhalb des durchsichtigen Schnappdeckels 316 angeordnet ist.

In Fig. 11 ist ein schematischer Querschnitt eines achten 30 Ausführungsbeispiels gezeigt. Im Gegensatz zum Ausführungsbeispiel ist hier der bewegliche Permanentmagnet 312 mit seinem Südpol in der Nähe der Außenseite der Anode 50 Entnahmeraums des Boden 20b angeordnet. Der durchsichtig. Gegenüber der Entnahmeöffnung 60 befindet sich 35

unterhalb des Bodens des Entnahmeraums 50 der Photomultiplier 314.

12 zeigt eine Draufsicht auf ein Fig. zweites Ausführungsbeispiel einer Elutionsvorrichtung. Dabei der in Fig. eine Mehrzahl 11 gezeigten Vorrichtungen nebeneinander angeordnet. An den Längsseiten der Vorrichtungen sind jeweils Thermostatplatten 329 vorgesehen, mit denen die Temperatur einstellbar ist.

10

Fig. 13 zeigt in schematischer Ouerschnittsansicht ein Ausführungsbeispiel einer Aufreinigungsund-Anreicherungsvorrichtung. Dabei sind die Elektroden 20a und 20b einer Vorrichtung gemäß Fig. 11 mit einer Spannungsquelle 15 220 verbunden. Die Vorrichtung gemäß Fig. 11 befindet sich im Wirkbereich eines x,y,z-Pipettierarms 190 eines Pipettierroboters. Die Spannungsquelle 220, die zweite Pumpe zur Entsorgung von zu verwerfenden Lösungen, Vorrichtung (hier nicht gezeigt) zur Bewegung eines 20 Permanentmagneten 312 sowie der x,y,z-Pipettierroboter sind mittels eines Prozeßrechners, bsp. eines Personal-Computers, vollautomatisch steuerbar.

Die Funktion der beschriebenen Vorrichtungen ist die 25 folgende:

Zu analysierende biologische nukleinsäurehaltige Flüssigkeiten werden mit einem Adsorptionsmittel 100 in Kontakt gebracht. Dabei adsorbieren die in der Lösung befindlichen Nukleinsäuren am Adsorptionsmittel 100. Das mit den Nukleinsäuren beladene Adsorptionsmittel 100, bsp. ein Spin-column 90, wird durch die zweite Öffnung 80 in den Reaktionsraum 17 eingesetzt. Anschließend wird an die Elektroden 20a, 20b eine Gleichspannung im Bereich von 1 bis 5000 V, vorzugsweise von 25 bis 500 V, angelegt. Die negativ

12

geladenen Nukleinsäuren werden dadurch vom Adsorptionsmittel 100 gelöst und in Richtung der in der Nähe des Entnahmeraums 50 angeordneten Anode 20b bewegt. Um einen direkten Kontakt der Nukleinsäuren mit der Anode 20b zu vermeiden, ist eine für Nukleinsäuren undurchlässige erste permeable Membran 30 vorgesehen. Infolge der in Richtung der Anode 20b gerichteten Nukleinsäuren reichern sich Bewegung der Entnahmeraum 50 an. Nach einer Elektrophoresedauer von 1 bis 180 min. wird der durch den Elektrophoresepuffer geleitete Entnahmeöffnung abgeschaltet. Durch die Entnahmeraums 50 kann nun ein angereicherte Nukleinsäuren enthaltendes Elutionsvolumen entnommen werden.

10

Um Kontaminationen zu vermeiden, kann die Entnahmeöffnung 60 15 mit dem Schnappdeckel 326 verschlossen werden, der mit einem Septum 328 versehen ist. Zur Entnahme von Elutionsvolumen kann das Septum 328 mit einer Nadel 327 durchstochen werden.

Je nach Art der zu isolierenden Nukleinsäuren können verschiedenartig gestaltete Elektroden 20a, 20b verwendet werden. In Frage kommt die Verwendung von aus Edelmetall oder aus leitfähigen Kunststoffen hergestellten Elektroden, die beschichtet sein können.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung kann mit einer Einrichtung 25 zur Detektion der Chemilumineszenz kombiniert werden. Dazu ist ein Photomultiplier 314 in der Nähe des Behälters 15 die Nukleinsäuren werden angeordnet. Zunächst elektrophoretisch vom Adsorptionsmittel 100 in Richtung der Anode 20b bewegt. Im Bereich der Anode 20b kann sodann, bsp. 30 nach der Polymerasekettenreaktion, eine Amplifikation der amplifizierten werden. Die durchgeführt Nukleinsäuren Nukleinsäuren werden dann durch Zugabe von Magnetpartikeln gebunden. Durch Heranführen des Permanentmagneten 312 an die mit Nukleinsäuren beladenen werden die 20b 35 Anode

10

Magnetpartikel an die Anode 20b angezogen. Nach Zugabe eines Chemilumineszenspuffers und Anlegen einer Spannung über den Elektroden 20a, 20b wird eine Chemilumineszens ausgelöst. Das dabei ausgesendete Licht wird durch den Photomultiplier 314 detektiert.

Die vorerwähnten Funktionen können mittels eines x,y,z-Pipettierroboters automatisiert werden. Damit ist es möglich, eine Mehrzahl der erfindungsgemäßen Vorrichtungen nacheinander automatisch zu bedienen.

Eine automatische Isolation von Nukleinsäuren kann mit den in den Fig. 4 und 13 gezeigten Aufreinigungs- und Anreicherungsvorrichtungen durchgeführt werden. Dabei hat sich folgendes Steuerungsprogramm als zweckmäßig erwiesen:

Schritt Nr.	Gerätemodul	Arbeitsschritt
1	x,y,z-Pipettor	hole Pipettenspitze aus Vorrat 185
2	x,y,z-Pipettor	gehe zu Probengefäß 165
3	x,y,z-Pipettor	nehme 210 μl Probe auf
4	x,y,z-Pipettor	gehe zu Reaktionsröhrchen 150
5	x,y,z-Pipettor	dispensiere 200 µl
6	x,y,z-Pipettor	verwerfe Pipettenspitze
7	x,y,z-Pipettor	hole Pipettenspitze aus Vorrat 185
8	x,y,z-Pipettor	gehe zu erstem Gefäß 160
9	x,y,z-Pipettor	nehme 710 μl Lyse-Reagenz auf
10	x,y,z-Pipettor	gehe zu Reaktionsröhrchen 150
11	x,y,z-Pipettor	dispensiere 700 µl Lyse-Reagenz
12	x,y,z-Pipettor	verwerfe Pipettenspitze
13	Thermomixer	schüttle für 1 min
14	Thermomixer	erhitze auf 75 °C
15	Steuerung	warte 10 min.
16	Thermomixer	kühle auf 25 °C

17	x,y,z-Pipettor	hole Pipettenspitze aus Vorrat 185
18	x,y,z,-Pipettor	gehe zu Reaktionsröhrchen 150
19	x,y,z-Pipettor	nehme 810 µl Lysemischung auf
20	x,y,z-Pipettor	gehe zu zweiter Öffnung 80
21	x,y,z-Pipettor	dispensiere 800 µl Lysemischung
22	x,y,z-Pipettor	verwerfe Pipettenspitze
23	Pumpe (130)	pumpe Lysemischung durch Adsorbtionsmittel und verwerfe
24	x,y,z-Pipettor	hole Pipettenspitze aus Vorrat 185
25	x,y,z-Pipettor	gehe zu zweitem Gefäß 162
26	x,y,z-Pipettor	nehme 710 µl Wasch-Reagenz auf
27	x,y,z-Pipettor	gehe zu zweiter Öffnung 80
28	x,y,z-Pipettor	dispensiere 700 µl Waschlösung
29	x,y,z-Pipettor	verwerfe Pipettenspitze
30	zweite Pumpe 130	pumpe Waschlösung durch Adsorbtionsmittel und verwerfe
31	erste Pumpe 120	pumpe Elektrophoresepuffer in den Tank
32	x,y,z-Pipettor	hole Pipettenspitze aus Vorrat 185
33	x,y,z-Pipettor	gehe zu Elektrophoresepuffervorrat 110
34	x,y,z-Pipettor	nehme 250 µl Elektrophoresepuffer auf
35	x,y,z-Pipettor	gehe zu zweiter Öffnung 80
36	x,y,z-Pipettor	verwerfe Pipettenspitze
37	Spannungsver-	lege Spannung an Elektroden 20a, 20b
	sorgung 220	
38	Steuerung	warte 20 min
39	x,y,z-Pipettor	hole Pipettenspitze aus Vorrat 185
40	x,y,z-Pipettor	nehme 60 µl isolierte Nukleinsäure aus Entnahmeöffnung 60
		auf
41	x,y,z-Pipettor	gehe zu PCR-Gefäßen 210
42	x,y,z-Pipettor	dispensiere 50 µl in PCR-Gefäße 210
43	x,y,z-Pipettor	verwerfe Pipettenspitze
44	zweite Pumpe 130	pumpe Elektrophoresepuffer aus dem Tank und verwerfe

Beispiel 1

WO 97/34908

15

Aufarbeitung einer Vollblutprobe mit Spin-column und Elektrophorese:

Alle Reagenzien sind aus dem QIAamp MBlood Kit 29104) der Firma Qiagen, Hilden entnommen. Nach Lyse und Adsorbtion der Nukleinsäure laut Protokoll des Herstellers das Glasfaservlies aus dem QIAamp spin wurde speziell präpariertes in ein herausgenommen und 5 Die Agaroseflachbettgel gemäß Fig. gegeben. erste Ausnehmung 81 dient zur Aufnahme des Glasvlieses und die 10 zweite Ausnehmung 61 ist mit Elektrophorespuffer befüllt. Auf diese Weise kann die Nukleinsäure elektrophoretisch aus dem Glasvlies eluiert und in das anschließende Agarosegel und in die zweite Ausnehmung 61 überführt werden. Aus der zweiten Ausnehmung 61 wurde die isolierte konzentrierte Nukleinsäure 15 entnommen.

Beispiel 2

20

25

30

35

Aufarbeitung einer Plasmaprobe

Alle Reagenzien sind aus dem QIAamp MBlood Kit (Kat.Nr. 29104) der Firma Qiagen, Hilden entnommen. Zur Aufarbeitung wurde das Glasfaservlies aus dem QIAamp spin column entfernt und in die Vorrichtung gemäß Fig.1 so eingesetzt, daß es am unteren Auslaß positioniert war. Das Volumen des gesamten Reaktionsgefäßes war 2 ml. Es wurden 200 µl Plasma laut Arbeitsanweisung des Herstellers verarbeitet. Zentrifugation erfolgte das Absaugen mit einer Membranpumpe der Fa. Eppendorf. Zur elektrophoretischen Elution wurde ein Elektrophoresepuffer nach Andrews A.T. (Andrew A.T.: Electrophoresis, Claredon Press, Oxford, 1985, S. verwendet. Als permeable Membran diente ein Dialyseschlauch der Fa. Neolab, Heidelberg (Best.Nr.: 2-9022). Als Elektroden

16

20a, 20b wurden Drähte mit 0,3 mm Durchmesser einer Platin-Ruthenium-Legierung verwendet und als Spannungsgeber der Elektrophoresespannungsgeber der Fa. Hölzel, Dorfen. Aus der Entnahmeöffnung 60 wurden 30 μ l Elutionsvolumen mit der Nukleinsäure entnommen.

Beispiel 3

5

10 Isolierung von DNA aus Hühnerblut

geschlachteten weißen Masthuhn wurde frisch Von Vollblut aus der Halsschlagader aufgefangen und sofort mit Ethylendiamintetraessigsäure (Fa. Sigma, München Best. Nr. E-5513) in einer Konzentration von 0,06 g EDTA/ml Vollblut 15 versetzt. Das EDTA-Vollblut wurde portioniert eingefroren und bei -15°C gelagert. Alle Reagenzien sind dem "High Pure PCR Template Preparation Kit" der Fa. Boehringer Mannheim (Best. Nr. 1 796 828) entnommen. 100 µl EDTA-Vollblut (s.o.) wurden mit 200 µl Lyse-Puffer und 60 µl Proteinase K jeweils aus dem 20 o.g. Reagenziensatz gemischt und 15 min. bei 70°C inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur werden 100 μl Isopropanol (Fa. Roth, Karlsruhe Best.Nr. 9866) hinzugegeben und kräftig gemischt. Anschließend wird die zähflüssige Reaktionsmischung Nr. 4151) durch mit einer Vakuumpumpe (Eppendorf, Hamburg 25 das Glasvlies gesaugt. Danach wurde das Vlies mit fünfmal 500 μl Waschpuffer (aus Kit s.o.) mit 80 % Ethanol (Fa. Roth, Karlsruhe Best. Nr. 5054) gewaschen. Dann wurde das Vlies aus dem Filter-Tube entfernt und in eine Vorrichtung gemäß Fig.5 in die erste Ausnehnung 81 überführt. Anschließend wurden ca. 30 0,5 ml Elektrophoresepuffer (10 mM Tris-HCl [Fa. München Best.Nr. T-8529] 5 mM Natrium-Acetat [Fa München Best. Nr. S-3272] 0,5 mM EDTA [s.o.] pH 8,2) auf das Vlies in die erste Ausnehmung 81 zupipettiert, der zuvor auf 70 °C erhitzt worden war. Danach wurde die Elektroelution 35

durch Anlegen einer Gleichspannung von max. 10 mA bei ca. 60 Spannungsquelle diente Als durchgeführt. С Elektrophoresetransformator der Fa Hölzel, Dorfen (Nr. 0 628/ 1985).Die Elution erfolgte in Fraktionen 1-7, wobei nach definierter Zeit (10-15 min) mit einer Eppendorfpipette 5 Fraktionen von ca 50 µl aus der Öffnung (61) entnommen und gesammelt wurden. Die Fraktionen wurden auf einem Agarosegel (0,05 mg Agarose in 60 ml Elektrophoresepuffer mit 40 μ l Ethidiumbromidlösung [100 mg Ethidiumbromid (Fa. München Nr. dest. Wasser] analysiert. E-8751) in 10 Kontrolle wurden 40 µl Lysemischung verwendet. Die Kontrolle und Fraktionen nach 15 min. Elektroelution zeigten eine fluoreszierende Bande nach Elektrophorese von 5 min. bei ca. 40 V und max. 50 mA unter Beleuchtung mit einer UV-Lampe der Roger Electronic Products (Nr. MD-1782GS). 15 Spannungsquelle diente ein Elektrophoresetransformator der Fa Hölzel, Dorfen (Nr. 0 628/ 1985).

20 Beispiel 5

Herstellung einer beschichteten elektrisch leitfähigen Kunststoffelektrode (Fig. 9)

25 Zunächst wird biotinyliertem Rinder-Immunglobulin G (R-IgG) hergestellt. Dazu werden 0,5 ml einer R-IgG-Lösung (2mg R-IgG (Boehringer Mannheim Cat.No. 1293621103 in 1 ml PBS NaH2PO4*1 H2O 2,76 g/l; Na2HPO4*2H2O 3,56 g/l; NaCl 8 g/l; pH mit 6 μl D-Biotinoyl-ε-aminocapronsäure-N-30 hydroxysuccinimidesterlösung in PBS und DMSO (Ansatz laut Biotin Labeling Kit von Boehringer Mannheim Best. 1418165) vermischt und 2,5 h bei Raumtemperatur auf einem Magnetrührer gerührt und anschließend über Nacht stehen lassen. Das molare Verhältnis von Biotin: R-IgG beträgt 20:1 35 bei diesem Ansatz.

10

15

Zur Beschichtung von elektrisch leitfähigem Kunststoff mit biotinyliertem R-IgG werden aus einem Rohling, hergestellt im Spritzgußverfahren aus PRE-ELEC TP 4474 (Premix Oy, Finnland), Scheiben von 4 mm Durchmesser ausgeschnitten, in einen Napf einer unbeschichteten Mikrotiterplatte gelegt und in einer Lösung von 0,2 ml Beschichtungspuffer (NaHCO3 4,2 g/l; pH 9,6) dreimal, dann in einer Lösung von 40 ml Beschichtungspuffer (NaHCO3 4,2 g/l;pH 9,6) und 6 µl R-IgG-Biotin-Lösung gewaschen. Die Beschichtung erfolgt über Nacht.

Anschließend werden die Scheiben 3 x mit je 100 ml Milli-Q-Wasser gewaschen, wobei durch Sedimentation oder Zentrifugation die Trennung von fester und flüssiger Phase erfolgt. Anschließend werden die Scheiben in 40 ml PBS wieder aufgenommen.

Beispiel 6

- 20 Durchführung einer Probenvorbereitung mit Elektroelution, Amplifikation und Elektrochemilumineszenz-Messung zum Nachweis von PCR-Amplifikaten
- Die in Fig. 14 gezeigte Vorrichtung wurde zur Durchführung 25 der Isolierung, Amplifikation und Chemilumineszenzmessung automatisch mit einem Computer-Programm mit den folgenden Programmschritten gesteuert:

Prozeßmodule	Einzelschritte		
Probenvorbereitung			
Lyse	Probe, Lysemischung, Proteinase K in Reaktionsraum 17		
·	pipettieren		
	Reaktionsraum 17 verschließen		
	Reaktionsraum 17 auf 70 °C temperieren		
	Reaktionsraum 17 auf RT kühlen		

	Reaktionsraum 17 öffnen
	Isopropanol zugeben
	Reaktionsmischung aus Reaktionsraum 17 durch zweiten
	Stutzen 85 absaugen
Elektroelution	Elutionspuffer zugeben
	Spannung an Elektroden 20a, 20b anlegen
	Nukleinsäure wandert in den Entnahmeraum 50
Amplifikation	Zugabe von PCR-Mix in den Entnahmeraum 50
	Verschließen von zweitem Stutzen 85, zweiter Öffnung 80
	und Entnahmeöffnung 60
	zyklisches Heizen und Abkühlen des Entnahmeraums 50
Denaturierung	Öffnen der Entnahmeöffnung 60
Sonden annealing	Zugabe von Ru-Sonde
	Verschließen von Entnahmeöffnung 60
	Aufheizen und Abkühlen des Entnahmeraums 50
Detektion	Öffnen von Entnahmeöffnung 60
	Zugabe von SA-Magnetpartikel durch Entnahmeöffnung 60
	Verschließen von Entnahmeöffnung 60
Magnetseparation	Anlegen von Dauermagnet 312 mit Magnetfeld für den
	Entnahmeraum 50
	Absaugen von Reaktionsmischung aus dem Entnahmeraum
	50
Magnetpartikel waschen	Zugabe von Waschlösung durch Entnahmeöffnung 60
(Option)	
	Entfernen des Magnetfeldes für den Entnahmeraum 50
	Absaugen der Waschlösung durch zweiten Stutzen 85
	Zugabe von Assay-puffer durch Entnahmeöffnung 60
Elektrochemilumineszenz-Messung	Anlegen von Spannung an die Elektroden 20a,b
	Messung der Lumineszens mittels Photomultiplier 314

Bezugszeichenliste

	10	Elektrophorosepuffertank
	11	Agaroseflachbettgel
5	15	Behälter
	17	Reaktionsraum
	20a	Kathode
	20b	Anode
	30	erste permeable Membran
10	31	zweite permeable Membran
	40	O-Ring
	41	erster Stutzen
	42	erste Öffnung
	43	Durchbruch
15	44	zweiter Stutzen
	4 5	dritter Stutzen
	46	dritte Öffnung
	49	Kanal
	50	Entnahmeraum
20	60	Entnahmeöffnung
	61	zweite Ausnehmung
	70	Füllstand
	80	zweite Öffnung
	81	erste Ausnehmung
25	85	zweiter Stutzen
	90	Spin-column
	100	Adsorptionsmittel
	110	Elektrophoresepuffervorrat
	120	erste Pumpe
30	125	Füllstutzen
	130	zweite Pumpe
	140	Ableitung
	150	Reaktionsröhrchen
	160	erstes Gefäß
3	5 162	zweites Gefäß

	165	Probengefäß
	170	Schüttelbock
	180	Pipettenspitze
	185	Vorrat an Pipettenspitzen
5	190	x,y,z-Pipettierarm
	210	PCR-Gefäße
	220	Spannungsquelle
	225a, b	elektrische Zuleitungen
	302	Stützvlies
10	303	weiteres Stützvlies
	310	semipermeable Membran
	312	Permanentmagnet
	313	Magnetpartikel
	314	Photomultiplier
15	316	durchsichtiger Schnappdeckel
	318	Schlauchstück
	320, 321	Ausnehmungen
	323	erste Lage
	324	dritte Lage
20	325	zweite Lage
•	326	Schnappdeckel
	327	Nadel
	328	Septum
	329	Heizplatten
25	340	Stopfen
	400	Deckel
	401	Vakuumanschluß
	402	Anschlüsse
	410	Mehrfachbehälter
30		

Patentansprüche

- 1. Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren aus biologischen nukleinsäurehaltigen Flüssigkeiten und Suspensionen, wobei
 - a) die Nukleinsäuren an ein Adsorptionsmittel (100) gebunden werden,
- 10 b) die Nukleinsäuren vom Adsorptionsmittel (100) eluiert und
- c) durch Elektrophorese von einem Reaktionsraum (17) in einen damit verbundenen Entnahmeraum (50) bewegt und dort angereichert werden.
 - 2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Adsorptionsmittel (100) nach der Adsorption gewaschen wird.
- 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Elution der Nukleinsäuren vom Adsorptionsmittel (100) mittels Pufferwechsel oder durch Elektrophorese erfolgt.
- 4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei das im Entnahmeraum (50) befindliche Elutionsvolumen kleiner ist als das Probenausgangsvolumen.
- 5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Nukleinsäuren vor der Adsorption durch Lyse freigesetzt 30 werden.
 - 6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei biologischen Flüssigkeiten oder Suspensionen durch Verflüssigung aus festem Material hergestellt werden.

- 7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei das Adsorptionsmittel (100) aus Silicagel, Glaspartikeln, Glasfaservlies oder Ionenaustauschmaterial besteht.
- 8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Adsorptionsmittel (100) aus mit Glas umfangenen magnetischen Partikeln besteht, und die an magnetischen Partikel adsorbierten Nukleinsäuren mittels eines Magneten (312) isoliert werden.

10

- 9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei nach der Elution eine Hybridisierung durchgeführt wird.
- 10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei 15 nach der Elution eine Amplifikation durchgeführt wird.
 - 11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei nach der Elution eine Chemilumineszenzdetektion durchgeführt wird.

- 12. Vorrichtung zur Isolierung von Nukleinsäuren aus biologischen nukleinsäurehaltigen Flüssigkeiten und Suspensionen, wobei ein Reaktionsraum (17) zur Aufnahme eines mit Nukleinsäuren beladenen Absorptionsmittels (100) mit
- einem Entnahmeraum (50) verbunden ist, und wobei die Nukleinsäuren mittels einer Elektrophoreseeinrichtung (20a, 20b) vom Reaktions- (17) in den Entnahmeraum (50) bewegbar und dort anreicherbar sind.
- 13. Vorrichtung nach Anspruch 12, wobei der Reaktionsraum (17) von einem Elektrophoresepuffertank (10) umgeben ist.
- 14. Vorrichtung nach Anspruch 13, wobei der Reaktionsraum (17) mit dem Elektrophoresepuffertank (10) ionenleitend verbunden ist.

15. Vorrichtung nach Anspruch 13 oder 14, wobei der Reaktionsraum (17) sich im Elektrophoresepuffertank (10) befindet.

5

- 16. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 12 bis 15, wobei der Reaktionsraum (17) über mindestens eine Öffnung (80) beschickbar und entsorgbar ist.
- 10 17. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 12 bis 16, wobei im Reaktionsraum (17) ein Adsorptionsmittel (100) für Nukleinsäuren aufgenommen ist.
- 18. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 12 bis 17, wobei 15 die ionenleitende Verbindung durch mindestens eine permeable, Nukleinsäuren zurückhaltende Membran (31) gebildet ist.
- 19. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 12 bis 18, wobei die Vorrichtung aus thermoplastischem Kunststoff hergestellt 20 ist.
 - 20. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 12 bis 19, wobei die Elektrophoreseeinrichtung mindestens zwei Elektroden (20a, 20b) aufweist, von denen mindestens eine in den Elektrophoresepuffertank (10) ragt oder Bestandteil desselben ist.
- Vorrichtung nach einem der Ansprüche 12 bis 19, wobei die Elektrophoreseeinrichtung mindestens zwei Elektroden aufweist, von denen mindestens eine in den 30 20b) (20a, den Bestandteil eines oder (50)ragt Entnahmeraum Entnahmeraum (50) umgreifenden Behälters (15) ist.
- 22. Vorrichtung nach Anspruch 20 oder 21, wobei eine der 35 Elektroden (20a, 20b) in den Reaktionsraum (17) ragt oder

Bestandteil eines den Reaktionsraum (17) umgreifenden Behälters (15) ist.

- 23. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 20 bis 22, wobei mindestens eine der Elektroden (20a, 20b) aus einem elektrisch leitfähigen Kunststoff hergestellt ist.
- 24. Vorrichtung nach Anspruch 23, wobei der elektrisch leitfähige Kunststoff elektrisch leitfähige Zuschlagstoffe,
 wie Graphit, Eisen, Silber oder andere Metalle, enthält.
 - 25. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 20 bis 24, wobei der Widerstand der Elektroden (20a, 20b) kleiner als 100 $\text{M}\Omega$ ist.
 - 26. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 20 bis 25, wobei die Elektroden (20a, 20b) eine Beschichtung aufweisen.
- 27. Vorrichtung nach Anspruch 26, wobei die Beschichtung aus 20 mehreren Lagen (323, 324, 325) besteht.
 - 28. Vorrichtung nach Anspruch 27, wobei mindestens eine Lage (323, 324, 325) aus einem biologischen Polymer gebildet ist, das vorzugsweise ein bindefähiges Protein ist.
 - 29. Vorrichtung nach Anspruch 28, wobei das bindefähige Protein ein Antikörper, ein Antigen oder eine Komponente eines anderen Ligand-Rezeptor-Paares ist.
- 30 30. Vorrichtung nach Anspruch 28, wobei das biologische Polymer derart ist, daß daran Nukleinsäuren bindbar sind.
 - 31. Vorrichtung nach Anspruch 28, wobei das biologische Polymer ein Oligonukleotid ist.

15

- 32. Vorrichtung nach Anspruch 28, wobei das biologische Polymer ein proteinähnliches Aminosäure-Konstrukt (PNA-Konstrukt) ist.
- 5 33. Vorrichtung nach Anspruch 27, wobei eine der Lagen (323, 324, 325) aus chemisch reaktiven Linkermolekülen besteht.
- 34. Vorrichtung nach Anspruch 20 oder 21, wobei zwei Elektroden (20a, 20b) in Gegenüberstellung in der Wandung des Behälters (15) vorgesehen sind.
 - 35. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 12 bis 34, wobei Mittel (312) zu Erzeugung eines an- und abschaltbaren Magnetfelds so angeordnet sind, daß der Behälter (15) vom Magnetfeld durchdringbar sind.
 - 36. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 12 bis 35, wobei in der Nähe des Behälters (15) eine Detektionseinrichtung, vorzugsweise ein Photomultiplier (314), angeordnet ist.
- 20 37. Vorrichtung nach Anspruch 36, wobei der Behälter (15) ein optisches Fenster (316) besitzt.
- 38. Elutionsvorrichtung mit einer Mehrzahl von Vorrichtungen 25 nach einem der Ansprüche 12 bis 37, wobei die den Vorrichtungen zugeordneten Elektroden (20a, 20b) elektrisch miteinander und mit einer Stromquelle (220) verbunden sind.
- 39. Elutionsvorrichtung nach Anspruch 38, wobei die 30 Vorrichtungen geometrisch im 96-Napf-Mikrotitrationsplattenformat angeordnet sind.
 - 40. Aufreinigungs- und Anreicherungsvorichtung mit einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 12 bis 37 oder einer

27

Elutionsvorrichtung nach Anspruch 38 oder 39, wobei mindestens eine der folgenden Einrichtungen vorgesehen ist:

- x,y,z-Pipettierarm (190),
- Thermo-Schüttelbock (170),
- 5 Heiz-/Kühlmittel (329) zum zyklischen Heizen und Kühlen,
 - Spannungsquelle (220),
 - mindestens zwei Elektroden (20a, 20b),
 - mindestens eine Pumpe (120, 130),
- mindestens ein Magnet (312),
 - mindestens ein Photomultiplier (314).
- 41. Aufreinigungs- und Anreicherungsvorichtung nach Anspruch 40, wobei die Vorrichtung, die Elutionsvorrichtung und die Einrichtung/en mittels eines Prozeßrechners automatischen zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 11 steuerbar sind.

Seite 1/16

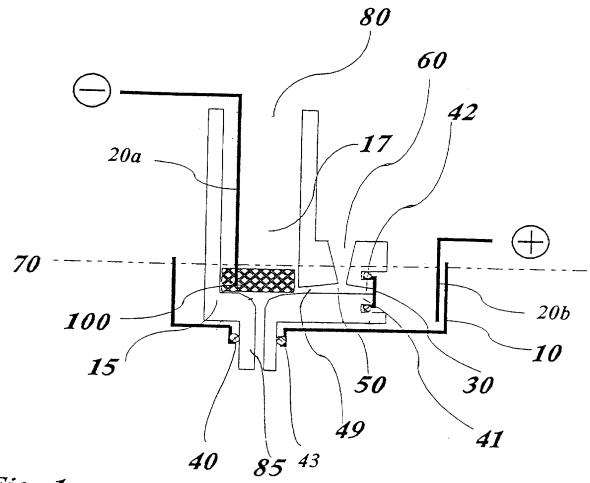


Fig. 1

Seite 2/16

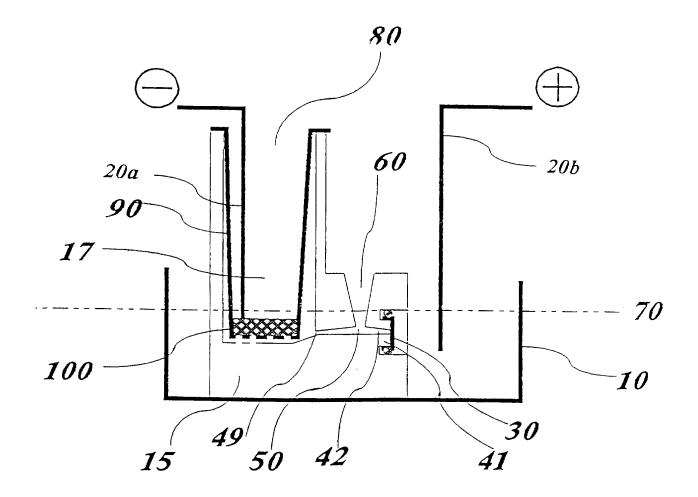
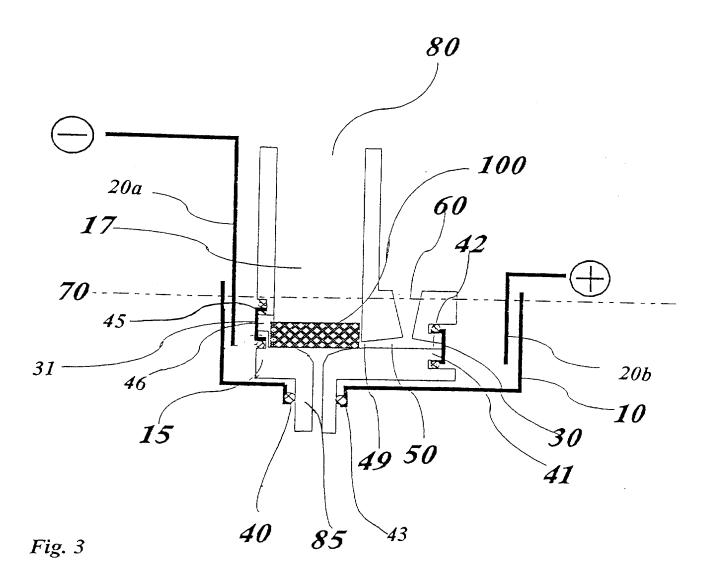
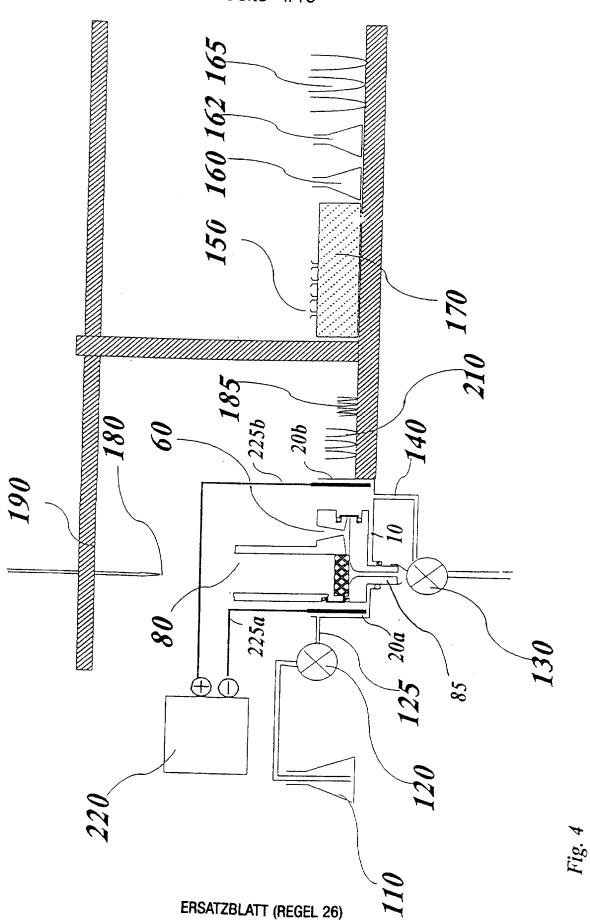


Fig. 2

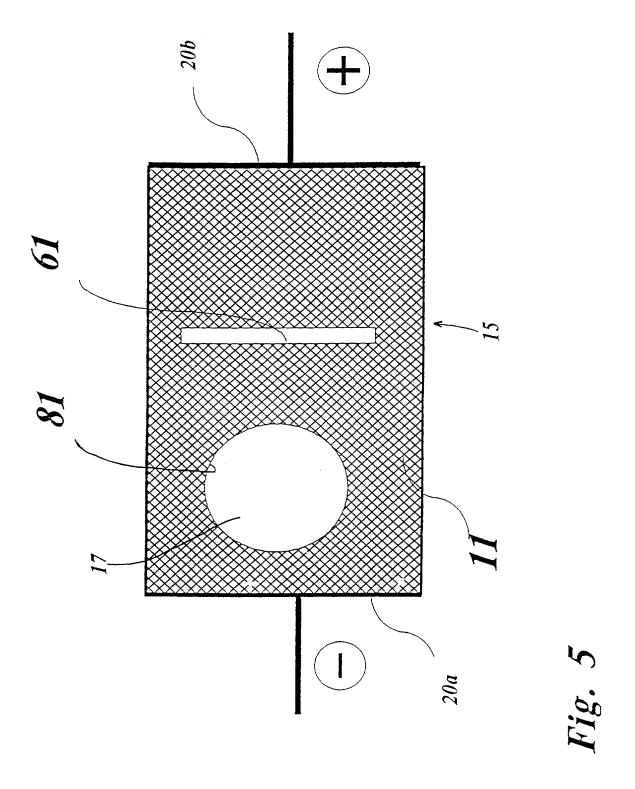
Seite 3/16



Seite 4/16



Seite 5/16



ERSATZBLATT (REGEL 26)

Seite 6/16

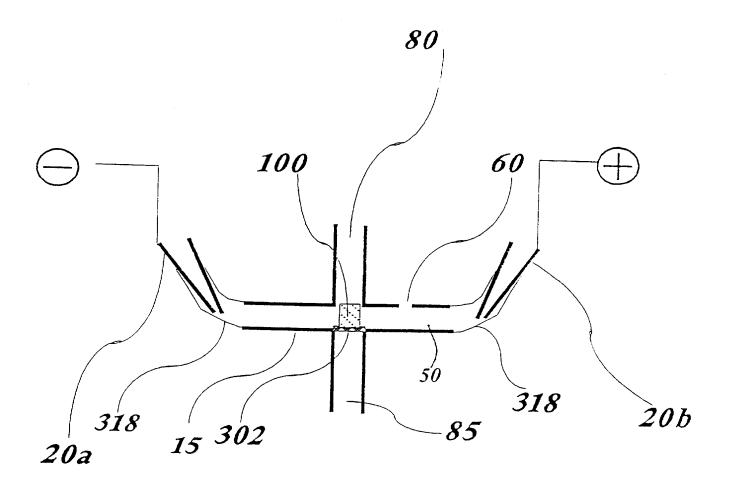
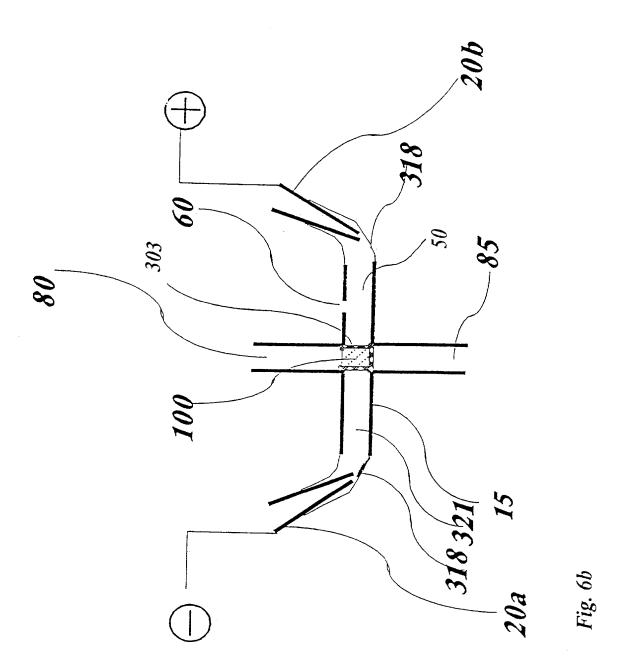


Fig. 6a

Seite 7/16



ERSATZBLATT (REGEL 26)

Seite 8/16

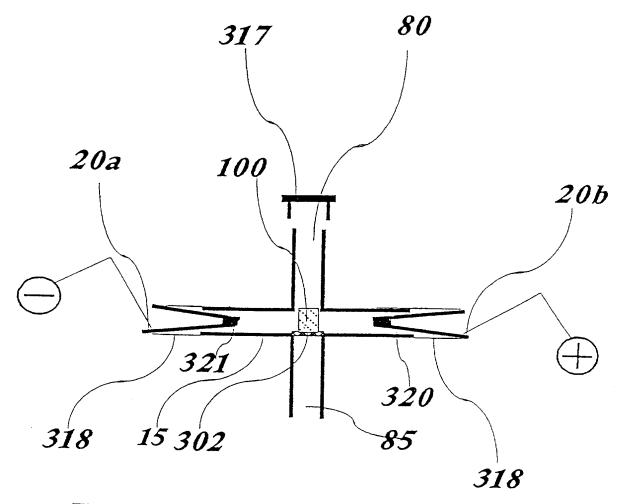
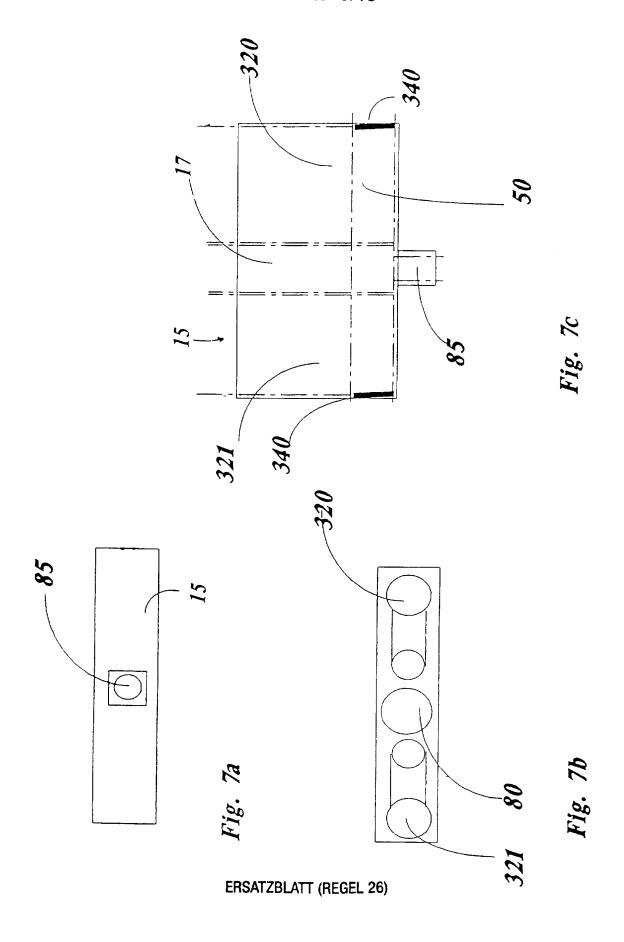
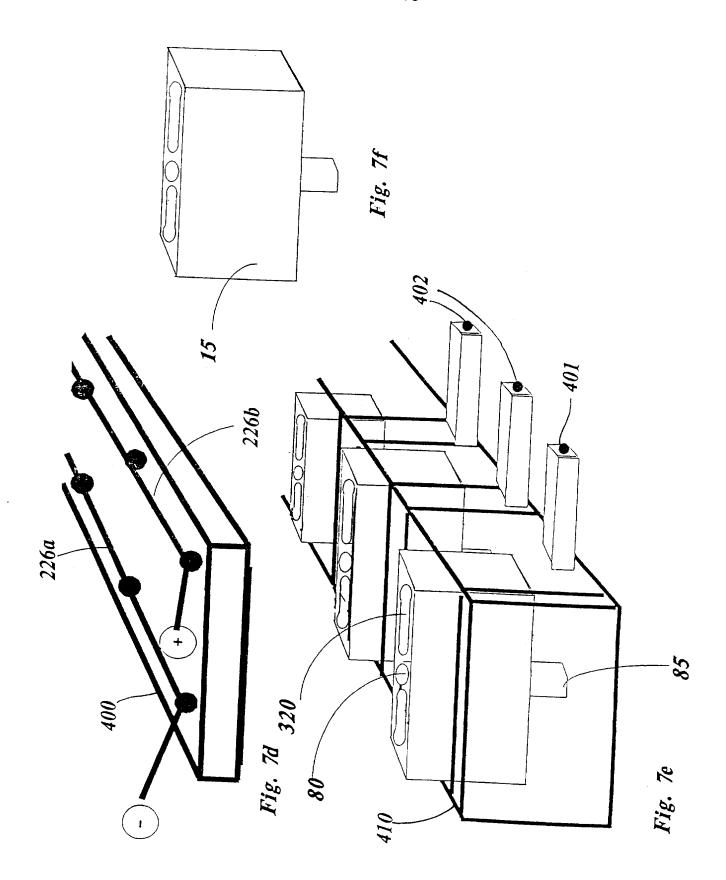


Fig. 6c

Seite 9/16

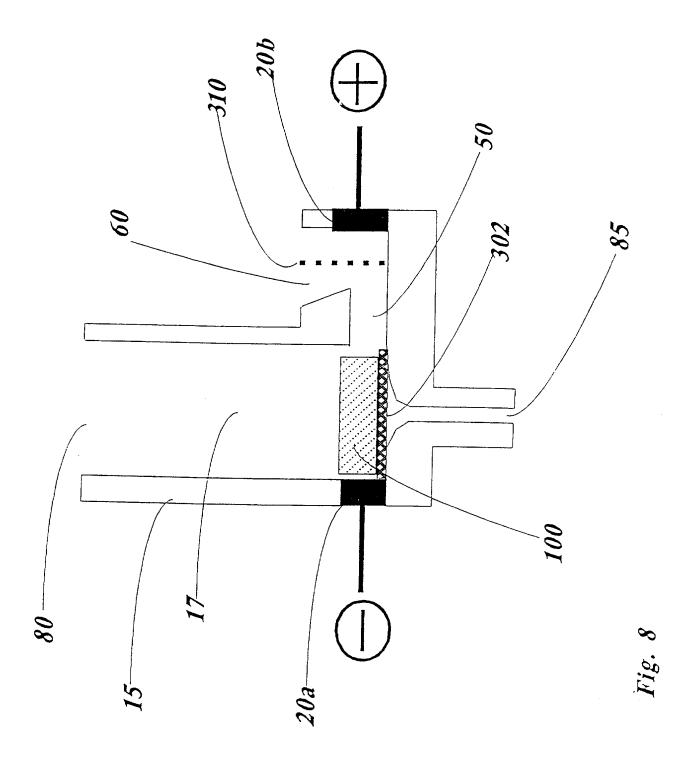


Seite 10/16



ERSATZBLATT (REGEL 26)

Seite 11/16



ERSATZBLATT (REGEL 26)

Seite 12/16

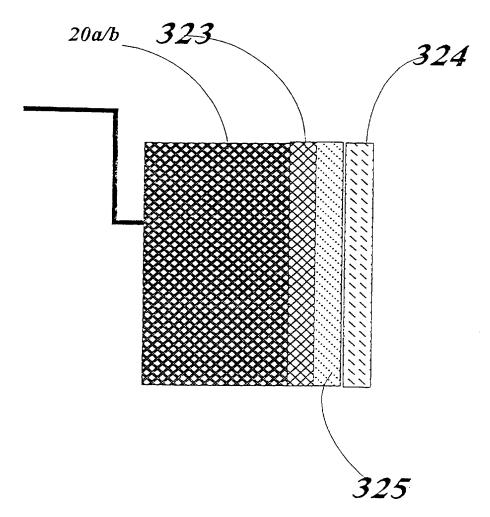
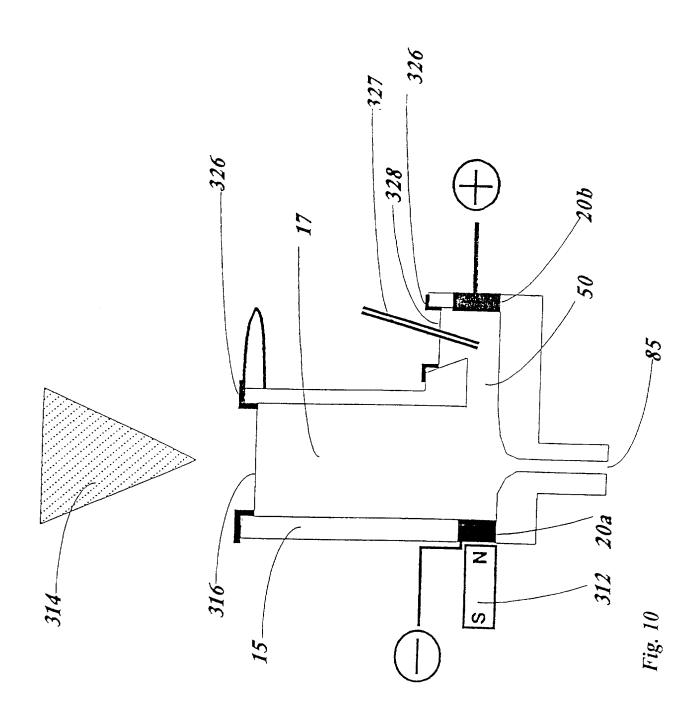


Fig. 9

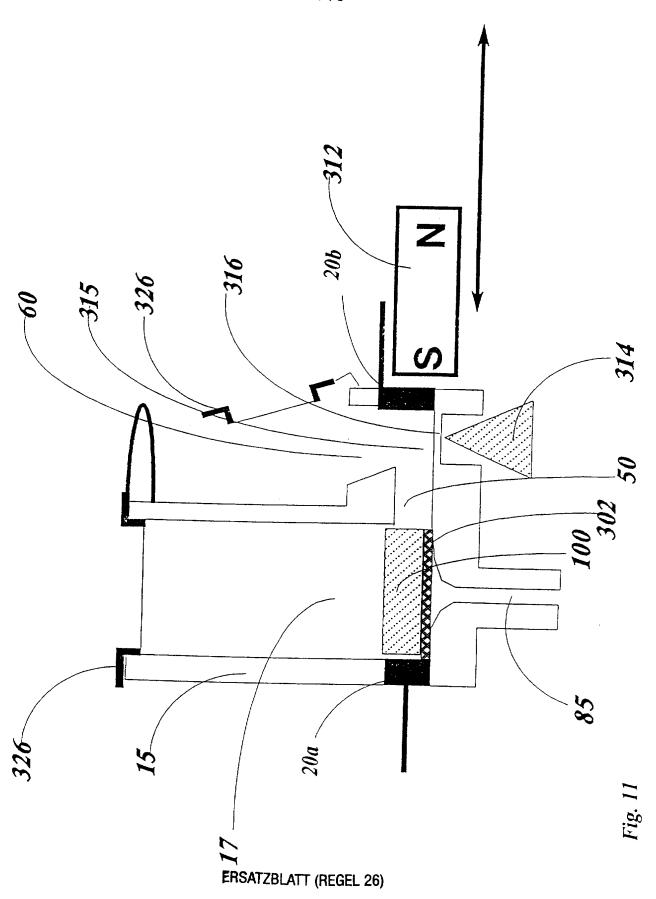
WO 97/34908 PCT/DE97/00517

Seite 13/16

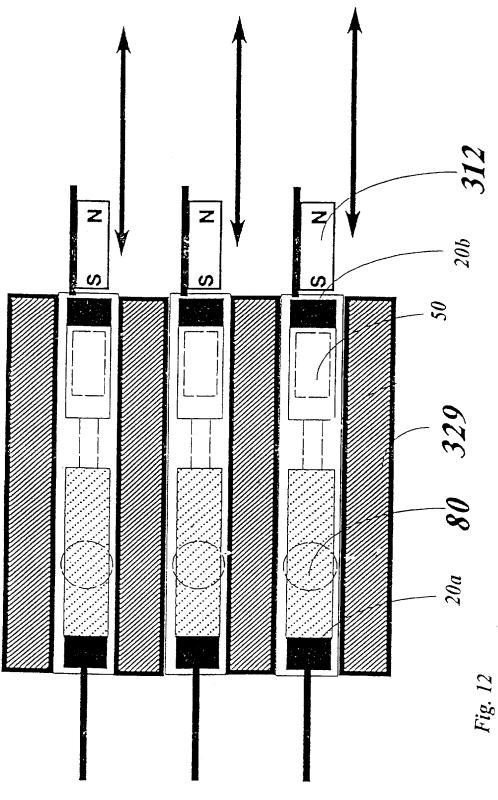


ERSATZBLATT (REGEL 26)

Seite 14/16

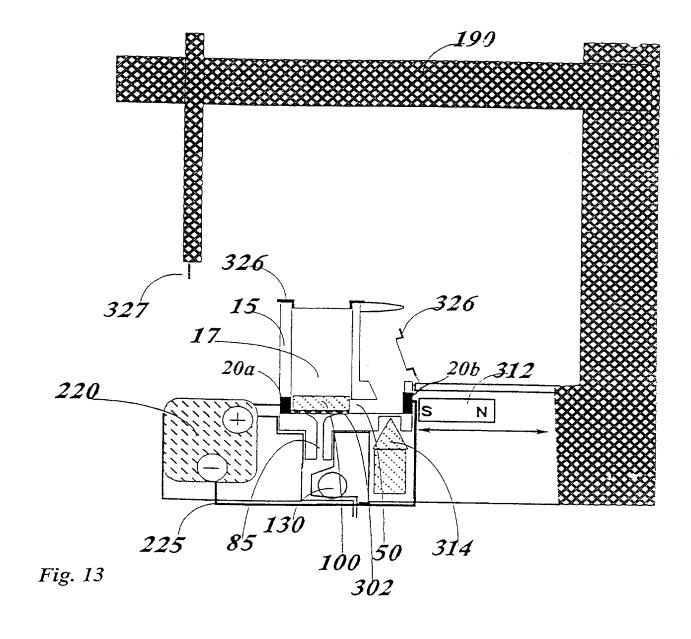


Seite 15/16



ERSATZBLATT (REGEL 26)

Seite 16/16



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter Ponal Application No PC 1/DE 97/00517

		PC:/DE 97	7/00517
A. CLASSI IPC 6	FICATION OF SUBJECT MATTER C07H1/08 C12Q1/68 C12N1	5/10 C12M1/00	
B. FIELDS	o International Patent Classification (IPC) or to both national c		
IPC 6	ocumentation searched (classification system followed by classi C07H C12Q C12N C12M	fication symbols)	
Documental	tion searched other than minimum documentation to the extent	that such documents are included in the fields	searched
Electronic d	ata base consulted during the international search (name of data	a base and, where practical, search terms used)	
	IENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of t	he relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 687 502 A (BOEHRINGER MANI 20 December 1995 see column 9 - column 10; clair 4-6	•	1,12
A	FR 2 402 716 A (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE) 6 April 1979 see page 3, line 16 - line 23; claims; examples		1,12
A	US 5 340 449 A (SHUKLA A.K.) 23 1994 see the whole document	3 August	1,12
		-/	
X Furt	ner documents are listed in the continuation of box C.	Patent family members are listed	in annex.
"A" docume conside "E" earlier of filing d "L" docume which is	egories of cited documents: ent defining the general state of the art which is not ered to be of particular relevance document but published on or after the international late of the which may throw doubts on priority claim(s) or is cited to establish the publication date of another or other special reason (as specified)	"T" later document published after the intro or priority date and not in conflict wind the conflict wind the understand the principle or the invention "X" document of particular relevance; the cannot be considered novel or cannot involve an inventive step when the do "Y" document of particular relevance; the	th the application but secry underlying the claimed invention be considered to cument is taken alone claimed invention
O' docume other n	ent referring to an oral disclosure, use, exhibition or	cannot be considered to involve an in document is combined with one or m ments, such combination being obvior in the art. '&' document member of the same patent	ore other such docu- us to a person skilled
	August 1997	Date of mailing of the international se	arch report
Name and m	hailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Day, G	

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter "onal Application No PCI/DE 97/00517

7 (62 - 1 - 1	tion) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	PC1/DE 9//0031/
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DE 41 39 664 A (DIAGEN INSTITÜT FÜR MOLEKULARBIOLOGISCHE DIAGNOSTIK GMBH) 3 June 1993 cited in the application see claims	1,12

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

Inter onal Application No PCI/DE 97/00517

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 687502 A	20-12-95	DE 4420732 A JP 8009957 A	21-12-95 16-01-96
FR 2402716 A	06-04-79	NONE	
US 5340449 A	23-08-94	NONE	**
DE 4139664 A	03-06-93	DE 59205979 D WO 9311218 A WO 9311221 A EP 0616638 A EP 0616639 A JP 7501222 T JP 7501223 T	15-05-96 10-06-93 10-06-93 28-09-94 28-09-94 09-02-95

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inter: vales Aktenzeichen PCI/DE 97/00517

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 6 C07H1/08 C12Q1/68 C12N15/10 C12M1/00 Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK **B. RECHERCHIERTE GEBIETE** Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 C07H C12Q C12N C12M Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN Kategone* Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile Betr. Anspruch Nr. EP 0 687 502 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 1,12 20.Dezember 1995 siehe Spalte 9 - Spalte 10; Ansprüche; Abbildungen 4-6 Α FR 2 402 716 A (INSTITUT NATIONAL DE LA 1,12 SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE) 6.April siehe Seite 3, Zeile 16 - Zeile 23; Ansprüche; Beispiele US 5 340 449 A (SHUKLA A.K.) 23.August 1,12 1994 siehe das ganze Dokument -/--Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu Ix I Siehe Anhang Patentfamilie entnehmen Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeidedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist 'X' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden L' Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsansprüch zweifelhaft er-scheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung,
eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach
dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder menrer
Veröffentlichung die seich auf eine mündliche Offenbarung,
diese Veröffentlichung die Veröffentlichung mit einer oder menrer
Veröffentlichung die veröffentl Datum des Abschlusses der internationalen Recherche Absendedatum des internationalen Recherchenberichts 27 -08- 1997 19.August 1997 Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde Bevollmächtigter Bediensteter Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Day, G Fax: (+31-70) 340-3016

1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Interr Nales Aktenzeichen
PC1/DE 97/00517

C.(Fortsetzu	ng) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht komm	nenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	DE 41 39 664 A (DIAGEN INSTITÜT FÜR MOLEKULARBIOLOGISCHE DIAGNOSTIK GMBH) 3.Juni 1993 in der Anmeldung erwähnt siehe Ansprüche		1,12

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlicht un, die zur selben Patentfamilie gehören

Inter onales Aktenzeichen
PCI/DE 97/00517

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 687502 A	20-12-95	DE 4420732 A JP 8009957 A	21-12-95 16-01-96
FR 2402716 A	06-04-79	KEINE	
US 5340449 A	23-08-94	KEINE	
DE 4139664 A	03-06-93	DE 59205979 D WO 9311218 A WO 9311221 A EP 0616638 A EP 0616639 A JP 7501222 T JP 7501223 T	15-05-96 10-06-93 10-06-93 28-09-94 28-09-94 09-02-95